

Entwicklung von Biosensoren für die biotechnologische Praxis

Schügerl, Karl

Veröffentlicht in:
Jahrbuch 1994 der Braunschweigischen
Wissenschaftlichen Gesellschaft, S.63-74



Verlag Erich Goltze KG, Göttingen

KARL SCHÜGERL, Hannover

Entwicklung von Biosensoren für die biotechnologische Praxis

Hannover, 29. April 1994*

Einleitung

Zur Verbesserung biotechnologischer Prozesse ist es notwendig, die wichtigsten Schlüsselkomponenten in den Kultivierungsmedien zu überwachen und zu regeln. Voraussetzung dafür ist die *In-situ*- und On-line-Messung dieser Größen. Dazu müssen die Analyseninstrumente an den Produktionsreaktor direkt angekoppelt werden. Wegen des hohen Preises dieser Instrumente würde die Ausstattung eines jeden Reaktors mit einem Analysensystem sehr aufwendig und teuer. Hier können die einfachen und preisgünstigen Biosensoren Abhilfe schaffen.

Biosensoren bestehen aus einem chemisch-spezifischen Empfänger (Enzym, Antikörper, Zelle), der mit einem sog. Transducer verbunden ist. Der Transducer ist ein physikalischer Sensor, der die chemischen Änderungen in der Empfängerschicht in Licht- oder elektrische Signale umwandelt. Abhängig davon, welchen physikalischen Sensor man verwendet, unterscheidet man zwischen

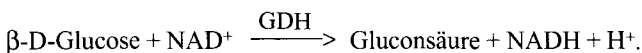
- potentiometrischen, amperometrischen, kalorimetrischen, optischen und mechanischen Sensoren.

Im Institut für Technische Chemie (TCI) der Universität Hannover werden potentiometrische, kalorimetrische und optische Sensoren entwickelt und zur Überwachung und Regelung biotechnologischer Prozesse eingesetzt. Daher werden hier nur diese Sensoren behandelt.

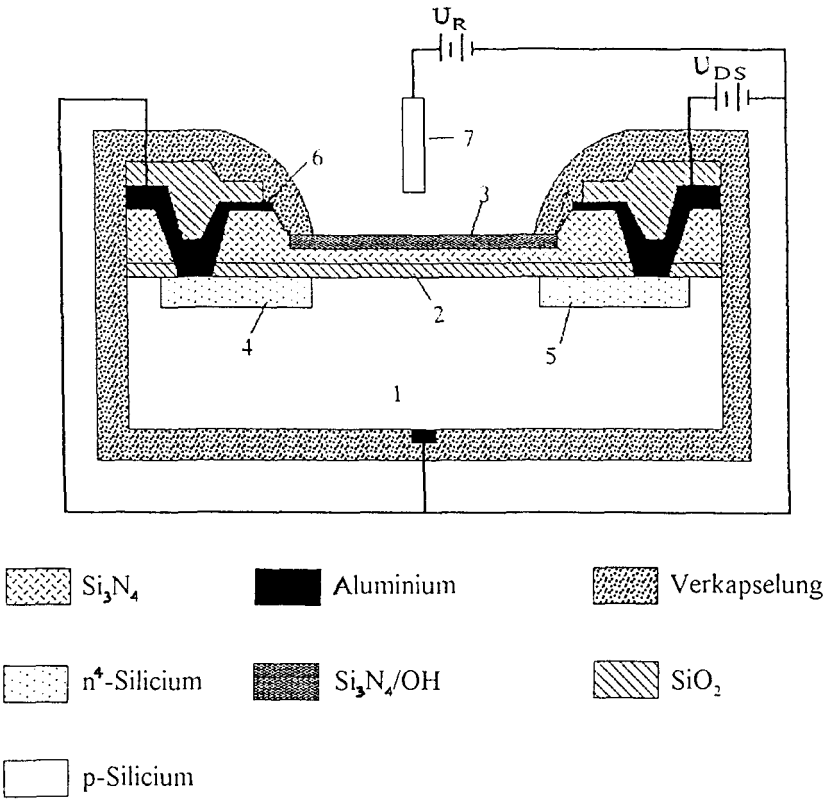
Potentiometrische Sensoren

Im TCI wurden zwei Typen von potentiometrischen Biosensoren verwendet: Feldefekttransistoren (FETs) (Abb. 1) mit pH-empfindlichem Gate (pH-FETs) und MOS (Metal-Oxide-Semiconductor) Kapazitäts-Sensoren (Abb. 2) mit pH-empfindlicher Oberfläche (pH-MOS-CAPs). Die pH-empfindlichen Gates und MOS-CAPs bestehen aus folgenden Schichten: Si/SiO₂/Si₃N₄ oder Si/SiO₂/Si₃N₄/Ta₂O₅.

Auf der Gateoberfläche (ca 0.25 mm²) des FET bzw. MOS-CAP-Oberfläche (0.5–1 cm²) wurden analytischspezifische Enzyme immobilisiert (Abb. 3). Bei der enzymatischen Umsetzung ändert sich der pH-Wert in der Enzym-Membran:



* Vortrag vor der Klasse für Mathematik und Naturwissenschaften der Braunschweigischen Wissenschaftlichen Gesellschaft



1 Halbleitersubstrat

2 elektrischer Isolator

3 pH-sensitive Schicht

4 Source

5 Drain

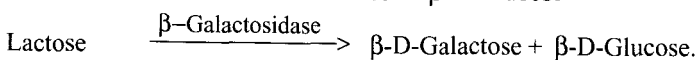
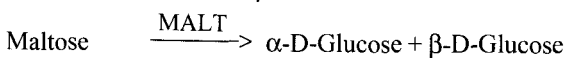
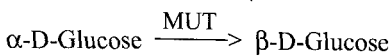
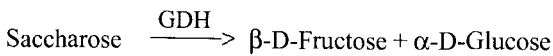
6 elektrische Kontaktierung

7 Bezugselektrode

Abb. 1: Schematischer Aufbau eines pH-FETs

Die pH-Änderung in der Membran verursacht im FET- bzw. MOS-CAP-Transducer ein elektrisches Signal, das der Analytkonzentration proportional ist.

Bei der Disaccharidanalyse muß das Disaccharid zuerst enzymatisch gespalten werden:



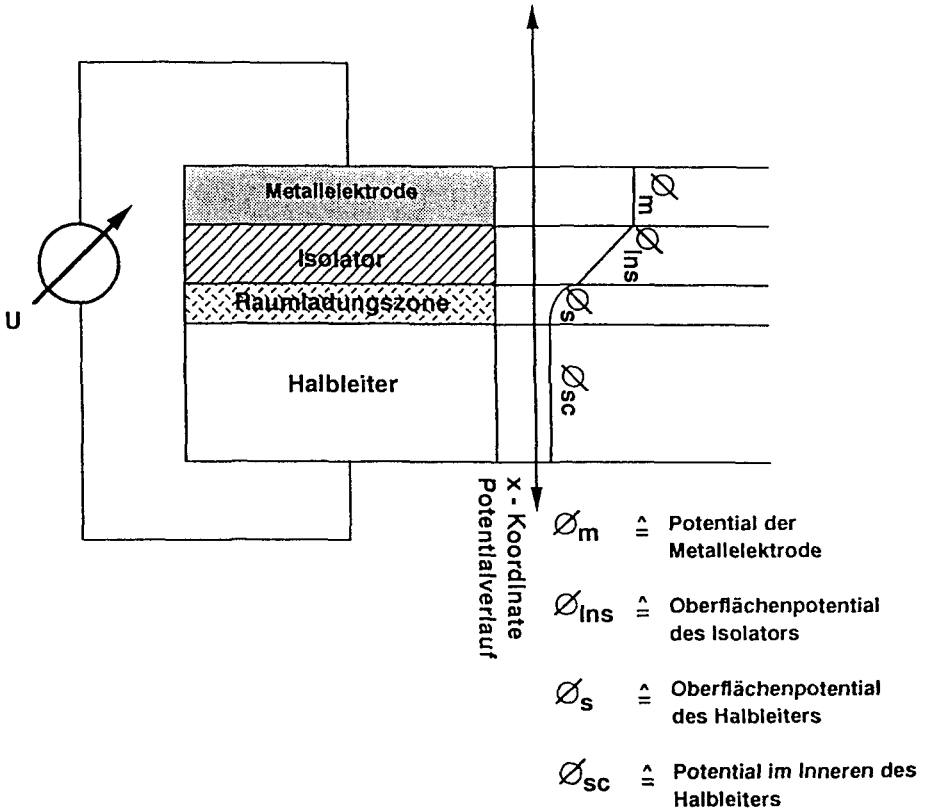


Abb. 2:
Potentialverlauf in einem MOS-CAP

Die bei der Spaltung gebildete β -D-Glucose wurde mit GDH in Gluconsäure umgesetzt und der pH-Wert gemessen. Hierbei wurden die Enzyme Glucosedehydrogenase (GDH) und Invertase (INV) und Mutarotase (MUT) bzw. GDH und Maltase (MALT), sowie GDH und β -Galactisidase koimmobilisiert.

Zahlreiche andere enzymatische Reaktionen wurden herangezogen, um die Konzentrationen folgender Verbindungen zu überwachen:

Penicillin G und V wurden mit Penicillin G-Amidase, Cephalosporin C mit Cephalosporinase umgesetzt, Harnstoff mit Urease, Glutamin mit Glutaminase und Glutaminsäure mit Glutamatdecarboxylase und die dadurch verursachte pH-Änderung detektiert.

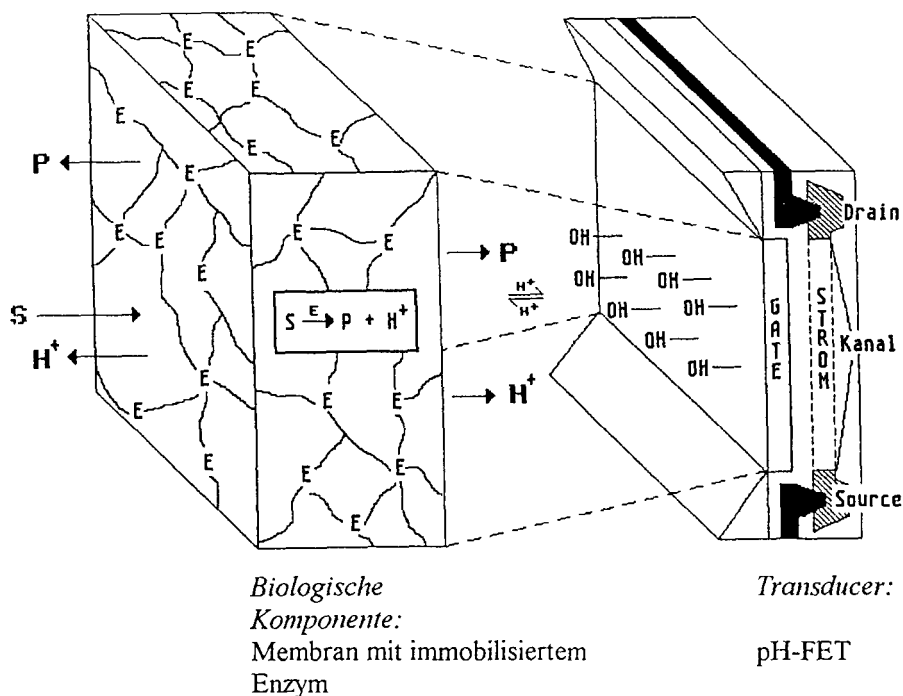
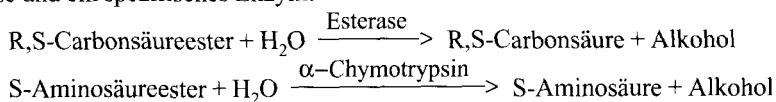


Abb. 3:
Funktionsschema eines Bio-FETs

Zur Enantiomerenanalytik wurden zwei Enzyme herangezogen, eine unspezifische Esterase und ein spezifisches Enzym:



Aus der Differenz der zwei Analysen läßt sich die Enantiomerenverteilung bestimmen.

Diese Bio-Sensoren wurden in Durchflußzellen eingebaut (Abb. 4) und in Fließinjektionsanalyse (FIA)-Systeme integriert (Abb. 5).

Die Fließinjektionsanalyse verwendet einen konstanten Pufferstrom, in den eine geringe Menge der Probe innerhalb einer kurzer Zeitspanne injiziert wird. Der Analyt in der Probe wird chemisch umgesetzt, und die Konzentration des Reaktionsproduktes wird im Detektor gemessen. Wird ein Biosensor als Detektor verwendet, so erfolgt sowohl die chemische Umsetzung (in der Enzymmembran) als auch die Messung der chemischen Änderung (der pH-Wert durch den Transducer) im Biosensor. Die Höhe des peakförmigen Signals oder der Peakfläche ist proportional der Analytkonzentration.

Die Bio-FET- und Bio-MOS-Cap-FIA-Systeme wurden mit Hilfe eines geeigneten Softwarepakets (CAFCA) automatisiert und zur Überwachung und Regelung der Her-

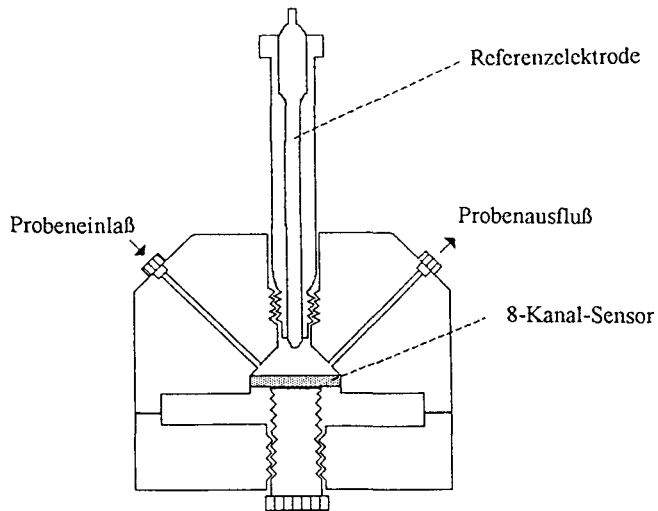


Abb. 4:
Längsschnitt durch eine Durchflußzelle

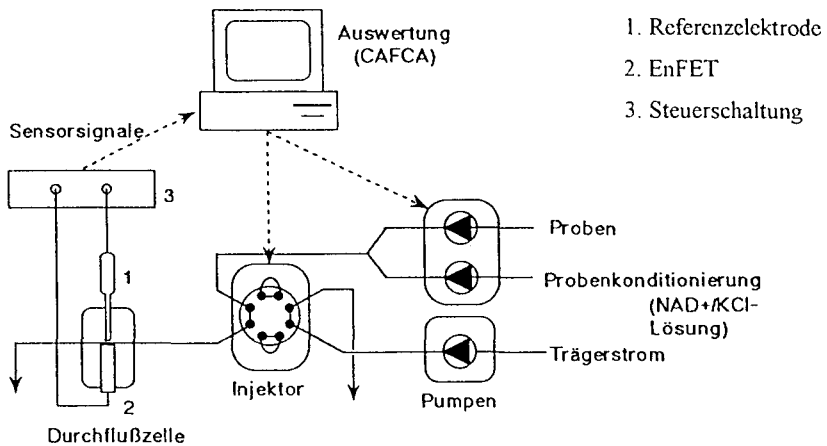


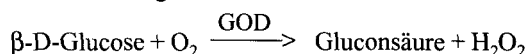
Abb. 5:
Verwendetes Fließinjektions-Analyse-System

stellung von Antibiotika, Waschmittelenzymen, Backhefe und rekombinanten Proteinen eingesetzt.

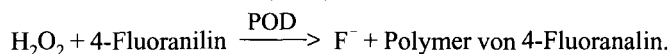
Der Nachteil der potentiometrischen Sensoren ist ihre starke Abhängigkeit von der Pufferkapazität und vom pH-Wert der Analytlösung.

Um diese Abhängigkeit zu eliminieren, wurde ein fluoridempfindlicher Sensor entwickelt. Er besteht aus folgenden Schichten: Si, SiO₂, Si₃N₄, LaF₃.

Bei der Anwendung von Oxidasen, z.B. Glucoseoxidase (GOD), entsteht H₂O₂:



In Anwesenheit von Peroxidase (POD) und 4-Fluoranilin entsteht Fluorid Ion:



Das F⁻-Ion läßt sich mit dem F-FET, bzw. F-MOS-CAP nachweisen.

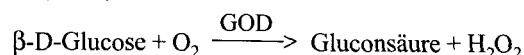
Dieser Sensor ist unabhängig von der Pufferkapazität und vom pH-Wert der Analytlösung.

Potentiometrische Biosensoren mit dünner Enzymmembran haben sehr kurze Ansprechzeiten und eignen sich daher sehr gut für FIA-Detektoren. Die Analysenfrequenz von FIA-Systemen mit Bio-FET- und Bio-MOS-CAP-Detektoren ist recht hoch, sie beträgt 15–25 Analysen pro Stunde.

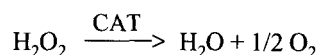
Kalorimetrische Biosensoren

In kalorimetrischen Sensoren mißt man die Wärmetönung der enzymatischen Reaktionen. In Abb. 6 ist ein Enzymthermistor schematisch abgebildet. Es werden zwei Enzymkartuschen verwendet, die mit an Trägerpartikel immobilisierten Enzymen gefüllt sind. In der Referenzkartusche wird jedoch das Enzym deaktiviert. Beide werden durch Pufferlösung unter exakt den gleichen Bedingungen durchströmt. Die Temperatur steigt in der Meßkartusche durch die enzymatische Reaktion. Die Temperaturänderungen in beiden Kartuschen, bedingt durch unspezifische physikalische Vorgänge, werden durch Messung des Temperaturanstiegs in der Referenzkartusche erfaßt. Aus der Differenz der Temperaturanstiegs in den zwei Kartuschen, die einige Grad Millikelvin betragen, wird die Analytkonzentration ermittelt.

Bei den Enzymthermistoren wählt man Reaktionen, die möglichst stark exotherm sind, um die Genauigkeit der Analyse zu erhöhen. Z. B. wird die Glucose hier mit Glucoseoxidase (GOD) in Gluconsäure



und das gebildete H₂O₂ mit Katalase (CAT) in Wasser und O₂



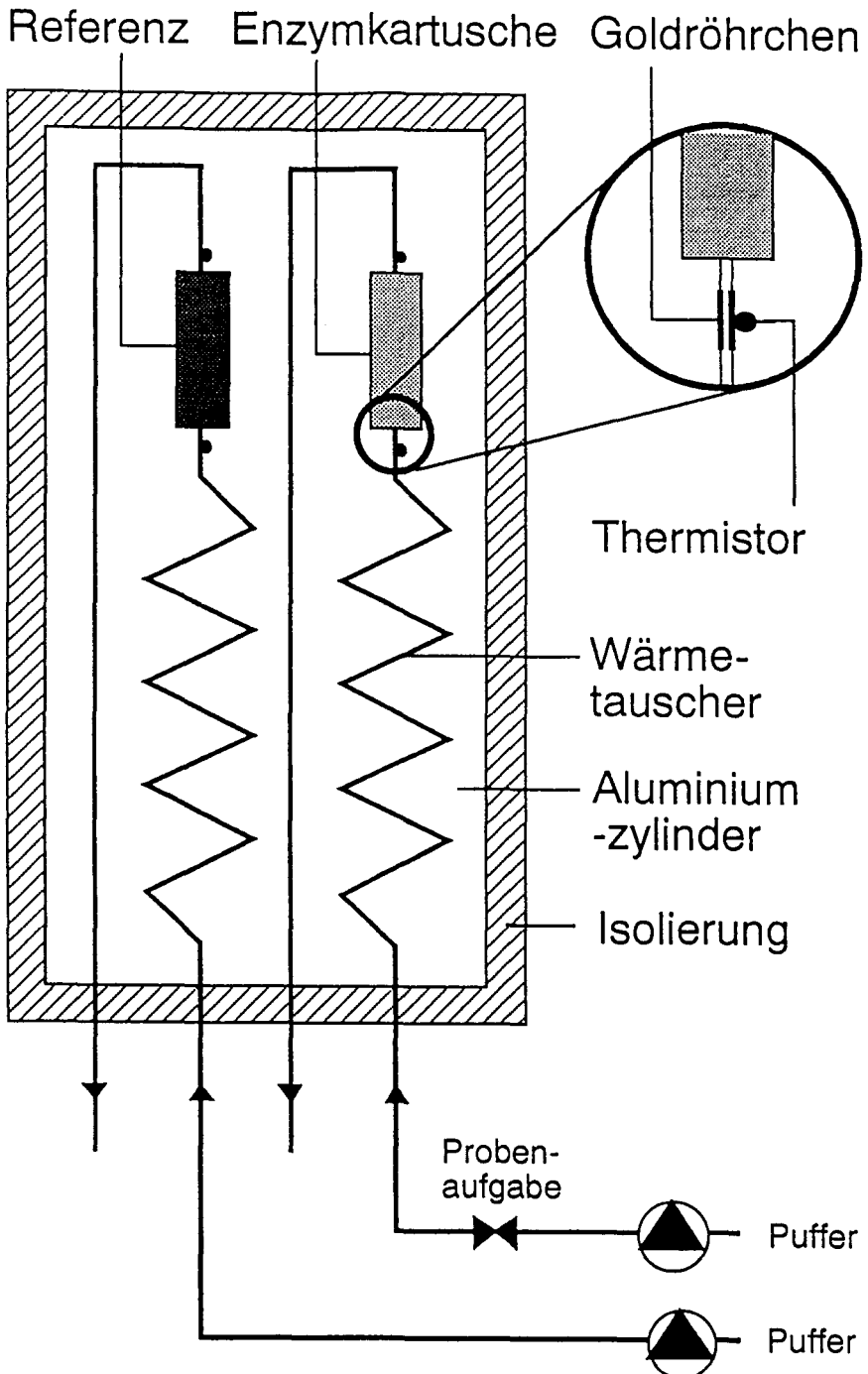


Abb. 6: Schematischer Aufbau eines Enzymthermistors

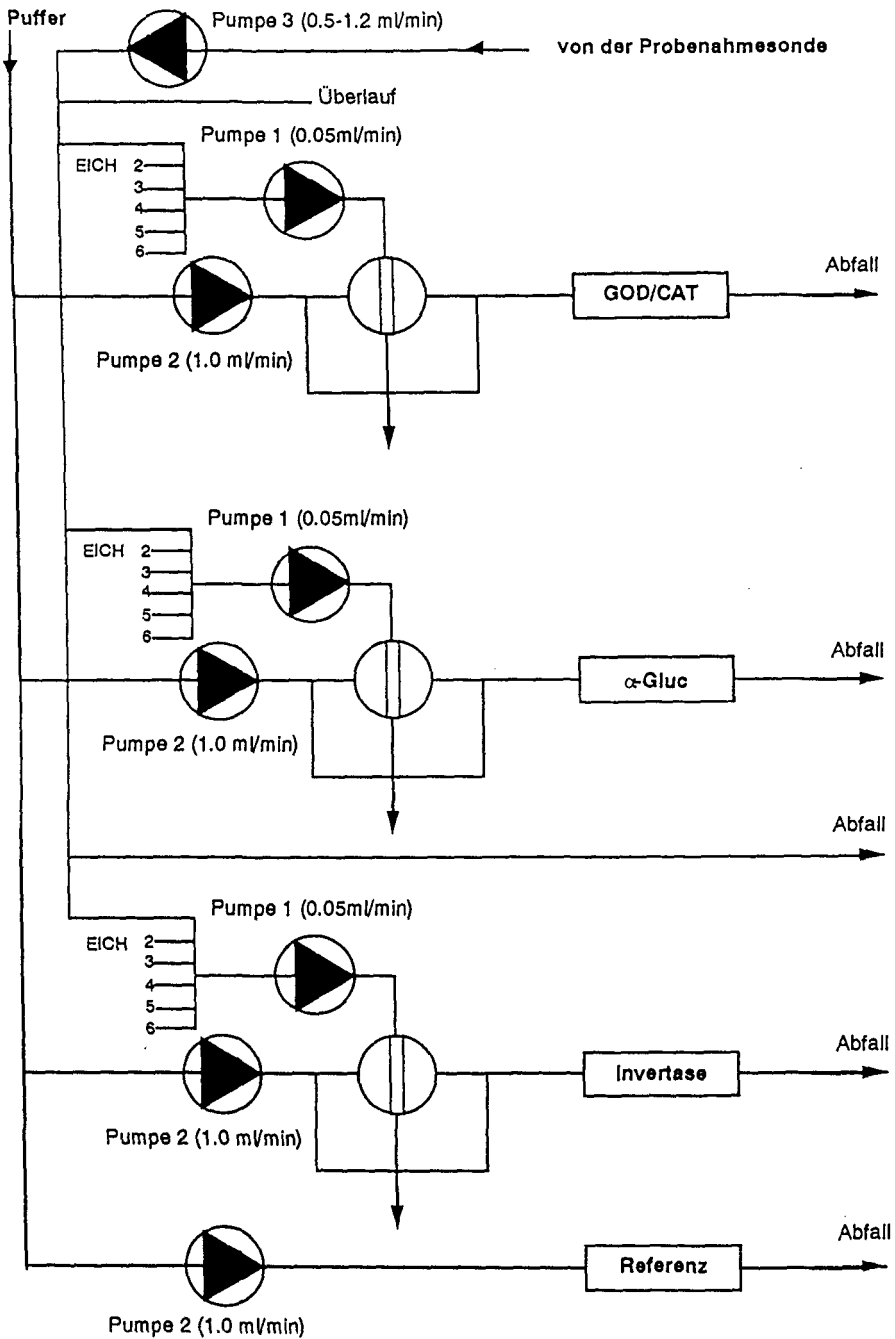


Abb. 7: Schematische Darstellung des Vierkanal-Enzymthermistors

umgesetzt. Da diese Reaktionen stark exotherm sind, läßt sich die Glucosekonzentration sehr genau bestimmen.

Wiederum lassen sich die Konzentrationen der Disaccharide durch ihre Umwandlung in Glucose bestimmen. In Abb. 7 ist ein Vierkanal-Enzymthermistor schematisch abgebildet. Im ersten Kanal wurde die Konzentration von Glucose mit GOD/CAT bestimmt, im zweiten Kanal die Konzentration von Maltose nach Spaltung mit Maltase (d.h. α -Glucosidase) und im dritten Kanal wurde die Konzentration von Saccharose nach Spaltung mit INV/MUT über die Konzentration von β -D-Glucose bestimmt.

Die Durchführung der Analyse erfolgte wiederum nach dem FIA-Prinzip. Eine geringe Menge der Probe wurde kurzzeitig in die zwei Pufferströme, die die Meß- und Referenzkartuschen passieren, injiziert und die Peakflächen bzw. Peakhöhen der Temperatursignale zur Auswertung herangezogen. Die Analysenfrequenz dieser Sensoren beträgt 12–20 Analysen pro Stunde.

Dieser Vierkanal-Enzymthermistor wurde automatisiert und zur Überwachung der Produktion alkalischer Protease (Waschmittelenzym) eingesetzt.

Optische Biosensoren (Bio-Optoden)

Zwei Typen von optischen Sensoren werden im TCI eingesetzt: Faseroptische Sensoren und Mini-Enzym-Membran-Reaktoren. An der Frontfläche der Glasfaser (von etwa 0,6 mm Durchmesser) wird eine Fluorophor-Membran gebildet. Mit einer UV-Lichtquelle wird der Fluoreszenzfarbstoff angeregt und die Fluoreszenzemission mit einem Photomultiplier gemessen. Das Anregungslicht und das emittierte Licht lassen sich durch denselben Lichtleiter führen, wenn die Stokes-Verschiebung (Differenz zwischen den Wellenlängen des Anregungslichtes und des emittierten Lichtes) groß genug ist. In diesem Falle lassen sich die Lichtstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge durch einen dichroitischen Spiegel trennen (Abb. 8).

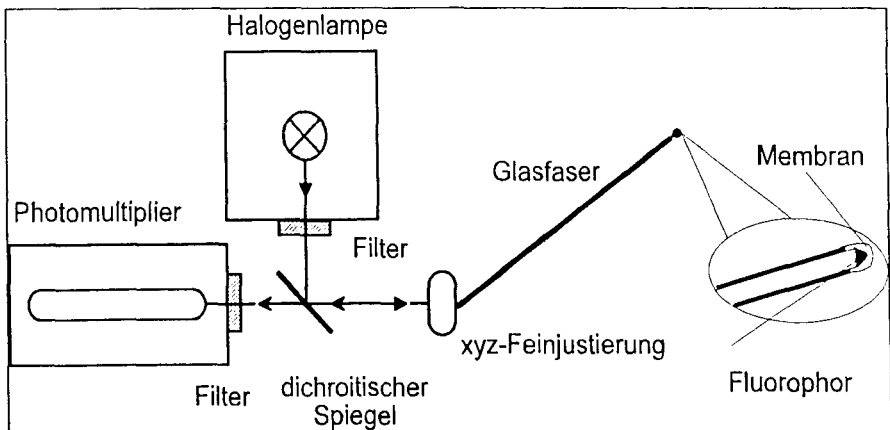


Abb. 8: Aufbau eines faseroptischen Sensorsystems

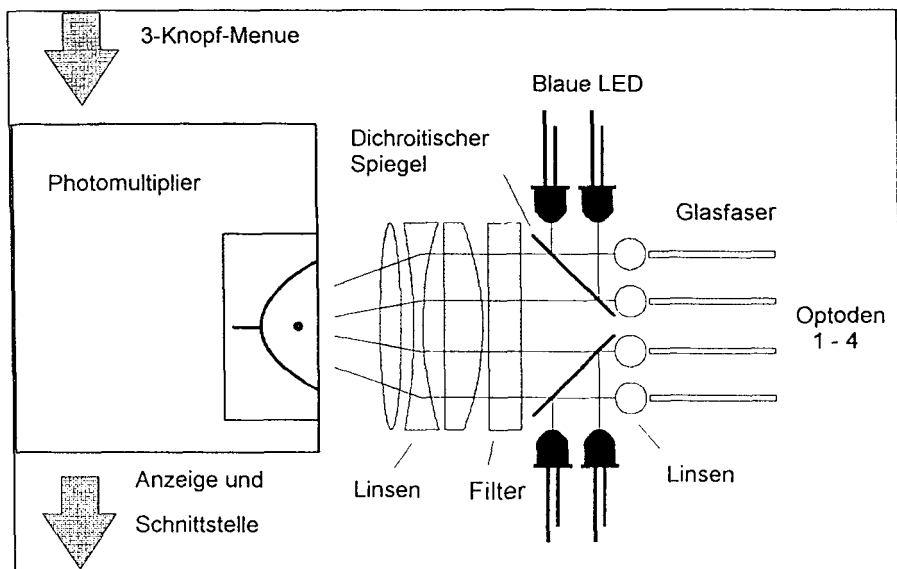


Abb. 9:

Schematischer Aufbau eines faseroptischen Vierkanal-Sensorsystems

Neuerdings lassen sich die Fluorophore durch blaue LED anregen (Abb. 9). Damit läßt sich die Meßanlage wesentlich vereinfachen. Es ist zu erwarten, daß in naher Zukunft UV-empfindliche Laser für die Detektion des emittierten Lichtes zur Verfügung stehen werden. Dann wären die Netzgeräte der faseroptischen Sensoren sehr klein und handlich.

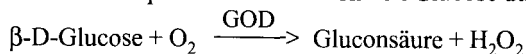
Zwei Typen von faseroptischen Sensoren werden verwendet: der eine nutzt die Beeinflussung der Fluoreszenzintensität durch den pH-Wert, der andere durch den Sauerstoff.

Die pH-empfindlichen Bio-Optoden bestehen aus einer pH-empfindlichen Fluorophor-Membran und einer Enzymmembran, die an der Oberfläche des Fluorophormembran immobilisiert sind.

Analog zu den Bio-FET- und Bio-MOS-CAP-Sensoren, werden Enzyme verwendet, die bei der Umsetzung der Analyten eine pH-Änderung in der Enzymmembran verursachen. Daher lassen sich dieselben Enzyme und Reaktionen verwenden.

Die anderen faseroptischen Sensoren nutzen das Löschen der Fluoreszenzemission durch den Sauerstoff. Hierzu werden Enzymreaktionen verwendet, die Sauerstoff verbrauchen.

Bekanntestes Beispiel ist die Oxidation von Glucose durch GOD in Gluconsäure:



Je höher die Glucosekonzentration, desto geringer die Sauerstoffkonzentration und desto höher die Fluoreszenzintensität.

Die große Zahl der Oxidasen ermöglicht einen breiten Einsatz der faseroptischen Sauerstoffsensoren zur Analyse von verschiedenen Sacchariden, Alkoholen und Aminosäuren.

Der Vorteil der faseroptischen Sauerstoffsensoren gegenüber den amperometrischen Sauerstoffsensoren ist, daß die optischen Sensoren keinen Sauerstoff verbrauchen. Daher sind die Signale der Optoden unabhängig von der Strömungsgeschwindigkeit und lassen sich auch in hochviskosen Systemen einsetzen.

Auch die faseroptischen Biosensoren werden als Detektoren in FIA-Systemen eingesetzt. Ihre Ansprechzeit ist länger als die der potentiometrischen und kalorimetrischen Biosensoren, aber kurz genug, um sie als Detektoren in FIA-Systemen zu verwenden. Die Analysenfrequenz dieser FIA-Systeme beträgt etwa 10–12 Analysen pro Stunde.

Im Mini-Enzym-Membranreaktor werden NAD/NADH-kofaktorabhängige Enzyme eingesetzt (Abb. 10). Während der enzymatischen Reaktion wird entweder NAD⁺ verbraucht und NADH gebildet, oder umgekehrt. Nur NADH ist fluoreszenzaktiv. Daher läßt sich die Reaktion durch die Messung der NADH-abhängigen Fluoreszenzintensität verfolgen.

Der Membranreaktor beinhaltet das Enzym A und den Kofaktor, die zur Umsetzung des Analyten benötigt werden. NADH wird mit UV-Licht bei 360 nm angeregt, und die Fluoreszenzemission wird bei 460 nm gemessen. Während der Analyse wird der Kofaktor umgesetzt. Da dieser sehr teuer ist, muß man aus Kostengründen seine Regenerierung vornehmen. Dazu wird ein Enzym B und ein Substrat verwendet, das während der Regenerierung des Kofaktors verbraucht wird. Wegen dieser Regenerierung ist die Analysenhäufigkeit recht gering (3–4 Messungen pro Stunde).

Wegen seines geringen Molekulargewichtes läßt sich der Kofaktor durch gängige UF-Membranen nicht im Reaktor zurückhalten. Daher wurde sein Molekulargewicht

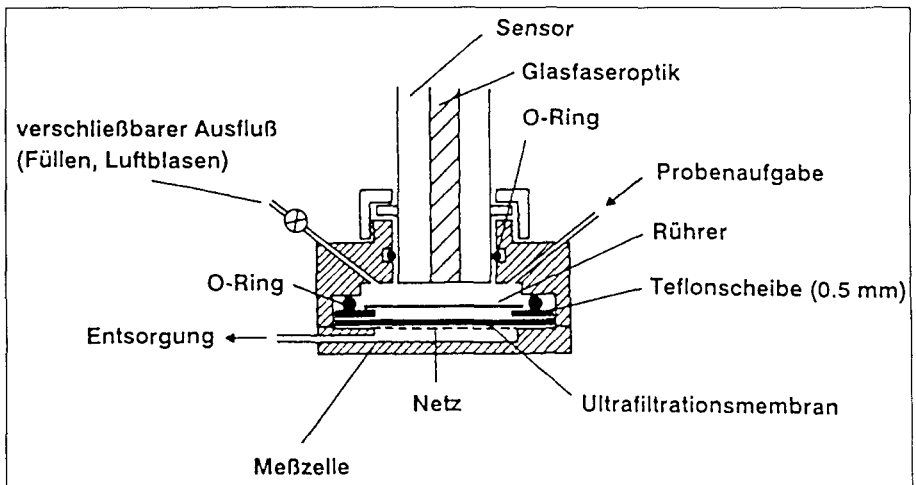


Abb. 10:

Schematische Darstellung des Mini-Enzymmembran-Reaktors

durch Kopplung mit PEG vergrößert. Die niedermolekularen Analyten passieren die UF-Membran, die Enzyme A und B sowie der molekularvergrößerte Kofaktor werden im Reaktor zurückgehalten.

Die Mini-Enzymmembran-Reaktoren wurden bisher kaum mit isolierten Enzymen eingesetzt. Um die Kofaktorregenerierung zu vermeiden, werden neuerdings permeabilisierte Zellen in diesen Reaktoren eingesetzt. Diese Zellen enthalten die zur Analyse notwendigen Enzyme und die Kofaktoren, die durch die Zelle immer wieder regeneriert werden.

***In situ*-Anwendung der Biosensoren**

Was ist der Grund dafür, daß Biosensoren bisher nur on-line und noch nicht *in situ* eingesetzt werden? Biotechnologische Herstellungsverfahren arbeiten mit reinen Kulturen. Daher werden der Reaktor und das Kultivierungsmedium vor Beimpfen durch Naßdampf bei 132–140° C sterilisiert, und während der Produktion wird jegliche Infektion durch fremde Keime durch geeignete Reaktorkonstruktion und Prozeßführung vermieden.

Man könnte nur dann Biosensoren in solchen Reaktoren *in situ* anwenden, wenn sie naßdampfsterilisierbar wären. Die natürlichen Enzyme sind jedoch nicht temperaturbeständig.

Vielleicht gelingt es, in Zukunft temperaturbeständige Enzyme herzustellen. Dann wäre es möglich, diese Biosensoren auch *in situ* zu verwenden.

Danksagung

Die vorgestellten Untersuchungen wurden im Rahmen von mehreren Doktor- und Diplomarbeiten im Rahmen von DFG- und BMFT-Projekten erarbeitet. Der DFG und dem BMFT danke ich für die finanzielle Unterstützung unserer Arbeit.

Herrn Prof. T. Scheper, Institut für Biochemie der Universität Münster, und Herrn Dr. R. Ferretti, Institut für Halbleitertechnologie der Universität Hannover, danke ich für die sehr gute Kooperation und meinen früheren und jetzigen Mitarbeitern für ihre Untersuchungen und aktive Mitwirkung.

Prof. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl
Arnumer Kirchstraße 31 · 30966 Hemmingen